



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

Escola Superior de Biotecnologia

CONTROLLED RELEASE OF TETHERED PEPTIDES FROM ALGINATE  
HYDROGELS VIA ENZYMATIC LINKER DEGRADATION

by

Mariana Moreira da Silva Alves Barbosa

September 2012



CATÓLICA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

CONTROLLED RELEASE OF TETHERED PEPTIDES FROM ALGINATE HYDROGELS VIA  
ENZYMATIC LINKER DEGRADATION

Thesis presented to *Escola Superior de Biotecnologia* of the *Universidade Católica Portuguesa* to fulfill the requirements of Master of Science degree in Biomedical Engineering

by

Mariana Moreira da Silva Alves Barbosa

Place: INEB- Instituto Nacional de Engenharia Biomédica, Biomaterials Laboratory

FCUP- Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Supervision: Cristina Carvalho Barrias, PhD.

Paula A. C. Gomes, PhD.

September 2012

**This thesis was supervised and co-supervised, respectively, by:**

Cristina Carvalho Barrias, PhD.

INEB- Instituto de Engenharia Biomédica, Biomaterials Laboratory

Paula A.C. Gomes, PhD.

FCUP- Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**The research described in this thesis was conducted at:**

INEB – Instituto de Engenharia Biomédica, Biomaterials Laboratory

FCUP- Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**The research described in this thesis was financially supported by:**

FEDER funds through the “Programa Operacional Factores de Competitividade” (COMPETE) and by Portuguese funds through “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” (FCT) in the framework of the project BIOMATRIX ref<sup>a</sup> PTDC/SAU-BEB/101235/2008 and FCOMP-01-0124-FEDER-010915.



## Abstract

Regenerative medicine requires innovative therapeutic designs to accommodate high morphogen concentrations in local depots and provide their sustained delivery for enhanced effectiveness.

The aim of this study was to develop a MMP-responsive hydrogel-based delivery vehicle for the active fragment of the osteogenic growth peptide (OGP10-14, YGFGG), to be used in bone regeneration therapies.

For this purpose two alternative peptide sequences were designed. These were synthesized using a solid-phase strategy (SPPS), by extending the original YGFGG sequence at its amine terminus with either a MMP-sensitive (PVGLIG) or a MMP-insensitive (scrambled, GIVGPL) domain. The designed sequences were then chemically conjugated to alginate, a hydrogel-forming polymer. The hypothesis behind the study was that in presence of specific MMPs (namely MMP-2) the PVLIG linker could be enzymatically cleaved leading to the release of OGP10-14 from the alginate hydrogel vehicle. In contrast, OGP would remain grafted when using the MMP-insensitive (scrambled) domain as linker.

The oligopeptide sequences were successfully synthesized by SPPS, and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Both were subsequently characterized in terms of their susceptibility to proteases. The extent of peptide cleavage upon incubation with MMP-2 was determined using the fluorescamine assay, and changes in the peptides molar mass were determined by LC-MS. The PVGLIG sequence was effectively hydrolyzed by MMP-2 at the predicted cleavage site (G↓L). The scrambled sequence was also partially cleaved, albeit unspecifically and at much lower rates. The kinetics of peptide digestion was further analyzed using custom-made FRET sequences, by monitoring the temporal increase in fluorescence resulting from peptide cleavage. Both peptides were partially cleaved by proteases present in serum, but the PVGLIG peptide was much more responsive to MMP-2 than the scrambled peptide.

Preliminary studies were carried out to evaluate the bioactivity of OGP10-14 when presented to human mesenchymal stem cells (hMSC) in both peptide sequences. Osteogenic differentiation was more efficiently promoted when OGP was incorporated in the MMP-sensitive oligopeptide.

Both peptides were conjugated to alginate via carbodiimide-mediated chemical grafting. The amount of immobilized peptide was quantified by UV-Vis and by the Total Protein Bicinchoninic acid (BCA) assay, which demonstrated that the coupling procedure was successful, with an efficiency around 41% (PVGLIG) to 62% (scrambled). MMP-2 digestion of peptide-alginate conjugates was analyzed by the fluorescamine assay. Higher enzymatic cleavage was observed in peptides-alginate conjugates with the MMP-sensitive PVGLIG linker.

Overall, this study provided proof-of-concept on the correct design of alginate-PVGLIG-conjugates, in the sense that, as expected, these were sensitive to MMP-2 mediated cleavage and may be a useful platform for the *in situ* delivery of OGP.

## Resumo

A medicina regenerativa requer intervenções terapêuticas inovadoras para acomodar elevadas concentrações de morfogênios em depósitos locais e proporcionar a sua distribuição sustentada para uma maior eficácia. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um hidrogel sensível à ação de MMPs para a liberação localizada do fragmento ativo do péptido promotor do crescimento osteogénico (OGP10-14, YGFGG), para aplicação em terapias de regeneração óssea.

Para este efeito, foram desenvolvidas duas sequências peptídicas distintas. Ambas foram sintetizadas utilizando uma estratégia em fase sólida (SPPS), através da extensão da extremidade amina da sequência original YGFGG, com uma sequência sensível a MMPs (PVGLIG) e com uma sequência insensível à ação da enzima (scrambled, GIVGPL). Após a síntese, os péptidos foram acoplados quimicamente ao alginato, um polímero com a capacidade de formar hidrogéis. O estudo baseia-se na hipótese de que, na presença de MMPs específicas (nomeadamente, a MMP-2), a sequência PVGLIG pode ser enzimaticamente clivada, ocorrendo a liberação do OGP10-14 a partir do hidrogel de alginato. Por outro lado, o OGP permaneceria acoplado ao hidrogel quando se utiliza a sequência insensível à ação da MMP-2 (scrambled).

As sequências peptídicas foram sintetizadas com sucesso por SPPS, e analisadas por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS). Posteriormente foram caracterizadas relativamente à sua sensibilidade à ação das proteases. A extensão da clivagem do péptido, após incubação com a MMP-2, foi determinada utilizando o ensaio de fluorescamina, e as alterações na massa molar dos péptidos foram determinadas por LC-MS. A sequência PVGLIG foi efetivamente hidrolisada pela MMP-2 no local de clivagem previsto (G↓L). O péptido scrambled foi, também, parcialmente hidrolisado, embora não especificamente e com taxas de clivagem mais reduzidas. A cinética de clivagem do péptido foi ainda analisada utilizando sequências FRET desenvolvidas para monitorizar o aumento, ao longo do tempo, de fluorescência resultante da fragmentação do péptido. Os resultados demonstraram que ambos os péptidos foram parcialmente clivados por proteases presentes no soro, no entanto, o péptido PVGLIG revelou-se muito mais sensível à ação da MMP-2 do que o péptido scrambled.

Foram também realizados estudos preliminares para avaliar a bioatividade do OGP10-14, através da incubação de células estaminais mesenquimais humanas (hMSC) com as duas sequências peptídicas. A diferenciação osteogénica foi promovida de forma mais eficiente na presença do péptido PVGLIG.

Os péptidos foram acoplados ao alginato por química de carbodiimida. A quantidade de péptido imobilizado foi quantificada por UV-Vis e através da quantificação da proteína total com ácido bicinconínico (BCA). Os resultados demonstraram que o procedimento de acoplamento foi bem-sucedido, com eficiências de 41% (PVGLIG) e 62% (scrambled). A clivagem do complexo péptido-alginato pela MMP-2 foi analisada recorrendo ao ensaio da fluorescamina. A hidrólise observada foi mais evidente no caso em que o alginato se encontrava acoplado ao péptido PVGLIG.

O estudo forneceu, assim, a “prova de conceito” de que o complexo PVGLIG-alginato foi corretamente desenvolvido, no sentido em que, como esperado, demonstrou ser sensível à clivagem por parte da enzima MMP-2 revelando potencial para ser uma plataforma útil para a liberação in situ de OGP.